

10/009603

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICECERTIFICATE OF TRANSLATION

Honourable Commissioner of  
Patents and Trademarks  
Washington, D.C. 20231

Sir:

I, CARLY ROSE, BSc, Technical Translator, of c/o Priory Translations Limited, 11, Magdalen Street, Colchester, Essex, England,

hereby state:

THAT I am well acquainted with the German and English languages.

THAT I translated the document identified as PCT Patent Application No. PCT/EP00/05418 filed on 13<sup>th</sup> June 2000 plus modified sheet from German into English;

THAT the attached English translation is a true and correct translation of PCT Patent Application No. PCT/EP00/05418, plus modified sheet,  
to the best of my knowledge and belief; and

THAT all statements made of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true and further, that these statements are made with the knowledge that wilful false statements and the like are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code

  
\_\_\_\_\_  
CARLY ROSE

## Support material and imaging method for intraoral diagnostic purposes

The invention relates to deformable, curable or film-forming support materials which contain diagnostically useful additives for intraoral diagnostics.

- 5 Furthermore, the invention relates to a process for the preparation of images for intraoral locus- and substance-specific diagnostic purposes as well as a process for the multiple and locus- and substance-specific investigation using the curable or film-forming support materials containing diagnostically useful additives. Such additives make it possible for the person skilled in the art to
- 10 prepare images for intraoral locus- and substance-specific detection of pathogenic substances and/or of microorganisms or for intraoral locus- and substance-specific detection of substances which indicate mouth diseases or healing processes.

- 15 The invention relates in particular to dental impression materials for intraoral diagnostics, which contain diagnostically useful additives as well as a process for the application of diagnostically useful additives to cured impression materials, the diagnostically useful additives being suitable for intraoral locus- and substance-specific detection of pathogenic substances and/or of
- 20 microorganisms or for intraoral locus- and substance-specific detection of substances which indicate mouth diseases or healing processes.

- The invention also relates to deformable or curable or film-forming support materials, in particular dental impression materials which can locus-
- 25 specifically absorb intraoral substances, these absorbed intraoral substances allowing the person skilled in the art to carry out test processes by applying diagnostically effective additives to the support materials which are suitable for intraoral locus- and substance-specific detection of pathogenic substances and/or of microorganisms, or for intraoral locus- and substance-specific
- 30 detection of substances which indicate mouth diseases or healing processes.

The locus- and substance-specific detection of substances in the oral environment is a problem which has been worked on for a long time. Single-site tests are known to the person skilled in the art (e.g. EP-A-0 304 871), all

of which are based on taking individual samples from definite points in the oral cavity, for example gingival pockets, the surfaces of teeth or root canals of teeth. Subsequent analysis of these samples is carried out using very widely varying methods, depending on the question asked, and a distinction should

5 be made between four general approaches:

1. The microbiological investigation often takes place after the samples have been incubated for several days in suitable culture media because the number of microorganisms originally present is not sufficient for a  
10 direct investigation. After the microorganisms have been multiplied the Colony-Forming-Units (CFU) are counted and the number of microorganisms present in the sample monitored (Kneist, S.; Klein, C.; Rupf, S.; Eschrich, K. Quintessenz (1999) 50, 33-43). The vital  
15 microorganisms present in the sample can multiply under optimal conditions in these test systems. The examination result thus indicates the maximum possible pathogenic potential of the evaluated microorganisms, if the microorganisms selectively attracted by definite culture media could multiply unhindered in the same way in the oral cavity.

20 However it is known that precisely such optimum growth conditions are not present in the oral cavity, so that the test result is therefore only conditionally meaningful.

25 Moreover, it must not be overlooked that a culture of pathogenic microorganisms is started by incubation of the samples which have to be treated in practice with corresponding precautionary measures to minimise risk. Special disposal is necessary. Along with these disadvantages the incubation method for microbiological investigation is  
30 expensive and very time-consuming.

2. Immunological methods provide a further general approach to microbiological investigation in Single-Site-Tests. In these methods monoclonal or polyclonal antibodies are used against surface structures

or separated substances of microorganisms. Moreover inflammation processes can also be followed with corresponding antibodies for example. Reference can be made, for example, to WO-94/12877, US-5 665 559, WO-96/07103 and WO-96/32647.

5

In comparison to the incubation methods according to paragraph 1, the immunological methods according to paragraph 2 are more specific, faster and more economical. However they have distinct weaknesses with regard to reproducibility, caused, amongst other things, by the sample taken. For example, not only vital, but also considerable quantities of dead microorganisms are to be found in one plaque region. Depending on the sample taken, the ratio of dead to vital microorganisms can be different. As the antibodies cannot distinguish between vital and dead microorganisms, an unpredictable range of variation results in deduction of the existing pathogenic potential of the evaluated microorganisms (Aass, A.M.; Preus, H.R., Zambon, J.J., Gjermo, P. Scand J. Dent Res (1994) 102, 355-360).

10

15

20

3. The method with the highest sensitivity is based on Poly-Chain-Reaction technology (PCR). The smallest amounts of microorganisms can be detected with high specificity. However the PCR technology is time-consuming, complex, expensive and not simple to control (Rupf, S., Kneist, S.; Merte, K.; Eschrich, K. Eur. J. Oral. Sci (1999) 107, 75-81).

25

30

4. Some further methods have been described which use biochemical markers in order to diagnose mouth diseases. The contribution from J. Meyle, Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift (1999) 54, 73-77) offers an overview. The meaningfulness of individual biochemical markers must be assessed discriminatively, taking clinical studies into consideration, and remains the preserve of the person skilled in the art. It must be stressed that determination by biochemical markers takes place using Single-Site methods. Reference is made for example to Patent Specification WO-98/21583. The auxiliary tools necessary here are characterized in that they bind the samples to be examined (WO-91/14000, EP-A-0 304 871,

US-A-5 725 373). For each sample site one auxiliary tool has to be used and analysed individually.

In principle, all Single-Site methods known from the state of the art have the  
5 decisive disadvantage that an approximately complete description of the  
situation in the oral cavity can only be gained with a large number of individual  
samples. Paper swabs are frequently used for sampling, as these can be  
inserted into gingival pockets or root canals (US-A-5 725 373, EP-A-0 304  
871).

10 It is known that the parodontitis activity from one gingival pocket to another in  
a patient can be very different, although the parodontitis exciter is located  
ubiquitously in the gingival pockets. Far more than 25 individual samples  
therefore have to be taken for one investigation and examined without it being  
15 possible to be sure that one or other focus of parodontitis does not remain  
unconsidered.

In principle, this shows that spot checks only allow unsatisfactory descriptions  
of the situation in the oral cavity. The time-consuming and expensive nature of  
20 single-site techniques can thus be only partly justified, and consequently  
single-site techniques have not found wide application in oral-cavity  
diagnostics.

For a long time there has therefore been an urgent need to make available a  
25 simple and economical process for simultaneous multiple as well as locus-  
and substance-specific intraoral investigation in the oral cavity.

The object of the present invention is to provide agents and methods for  
intraoral locus- and substance-specific, and at the same time, multiple  
30 detection of pathogenic substances and/or of microorganisms or of intraoral  
locus- and substance-specific detection of substances, which indicate mouth  
diseases or healing processes.

In the course of the description of the invention by pathogenic substances and/or microorganisms to be detected, or substances which indicate mouth diseases or healing processes is meant, for example, the following:

- 5 1. Metabolic products of bacteria, viruses or fungi, for example antigens, lipids, proteins, peptides, polysaccharides, DNA, RNA, sugars, amino acids, carboxylic acid, for example lactic acid and propionic acid, as well as other low molecular, anionic, cationic or neutral substances and combinations of these, which result for example from ionic, polar,  
10 nonpolar, hydrophobic, covalent or adhesive interactions.
2. Surface structures of bacteria, viruses or fungi, consisting for example of antigens, lipids, proteins, peptides, polysaccharides, DNA, RNA, sugars, amino acids or other low molecular, anionic, cationic or neutral  
15 substances and combinations of these, which result for example from ionic, polar, nonpolar, hydrophobic, covalent or adhesive interactions.
3. Human or animal substances which are formed in response to infections by bacteria, viruses or fungi, consisting for example of antibodies,  
20 antigens, lipids, proteins, peptides, polysaccharides, DNA, RNA, sugars, amino acids or other low molecular, anionic, cationic or neutral substances and combinations of these, which result for example from ionic, polar, nonpolar, hydrophobic, covalent or adhesive interactions.
- 25 4. Human or animal substances, which indicate mouth disease which are not caused *a priori* by a bacterial, virus or fungus infection (for example, cancers) consisting for example of antibodies, antigens, lipids, proteins, peptides, polysaccharides, DNA, RNA, sugars, amino acids or other low molecular, anionic, cationic or neutral substances and combinations of  
30 these, which result for example from ionic, polar, nonpolar, hydrophobic, covalent or adhesive interactions.
5. Substances which are found in structures which are known to be the result of or the precondition for the occurrence of mouth diseases, for

example plaque or biofilm, consisting for example of antibodies, antigens, lipids, proteins, peptides, polysaccharides, DNA, RNA, sugars, amino acids or other low molecular, anionic, cationic or neutral substances and combinations of these, which result for example from ionic, polar, nonpolar, hydrophobic, covalent or adhesive interactions.

6. Substances which indicate current healing processes, which are known to be the result of oral diseases or injuries, for example tissue and/or bone regeneration, consisting for example of antibodies, antigens, lipids, proteins, peptides, polysaccharides, DNA, RNA, sugars, amino acids or other low molecular, anionic, cationic or neutral substances and combinations of these, which result for example from ionic, polar, nonpolar, hydrophobic, covalent or adhesive interactions.

- 15 The substances listed above are examples of such substances which can be used alone or in combination for the purpose of diagnosing intraoral diseases and are described below as marker compounds.

According to the invention the object described is achieved by deformable, curable or film-forming support materials, which bind/absorb marker compounds, so that the diagnosis takes place for example on or in the support material. The invention relates to deformable, curable or film-forming support material, which is characterized in that it contains additives diagnostically useful for the locus- and substance-specific intraoral diagnosis which lead to a diagnostic result without a cultivation step. The diagnostically useful additives are used in particular for intraoral locus-specific detection of pathogenic substances and/or of micro organisms or for intraoral locus-specific detection of substances which indicate mouth diseases or healing processes. The additives can be present in microcapsulated form. The support materials should contain at least enough diagnostic additives for a diagnostic signal to be observed.

The invention further relates to a process for the preparation of images for intraoral locus- and substance-specific diagnostic purposes, which is

characterized in that diagnostically useful additives are applied to deformable, curable or film-forming support materials that contain no diagnostically useful additives, in such a quantity that a diagnostic signal can be observed, the additives leading to a diagnostic result without a cultivation step.

5

The invention also relates to processes for simultaneous multiple as well as locus- and substance-specific intraoral investigation, including the steps:

Taking of impression with deformable, curable or film-forming support material, which contains diagnostically effective additives, and possibly

10 application of further diagnostically effective additives, or taking of impression with deformable, curable or film-forming support material, which contains no diagnostically effective additives, and application of diagnostically effective additives.

15 The diagnostically useful additives which can be used according to the invention are partly commercially available and can if necessary be physically, chemically, biochemically or genetically modified; this also applies in particular to enzymes and their substrates, to antibodies and their antigens and to oligonucleotides and polynucleotides.

20

The diagnostically useful additives allow the person skilled in the art to carry out diagnostic test processes which are suitable for intraoral locus- and substance-specific detection of pathogenic substances and/or of microorganisms, or which are suitable for intraoral locus- or substance-

25 specific detection of substances which indicate mouth diseases or healing processes.

The mouth diseases which can be diagnosed include caries, early onset parodontitis, prepubertal parodontitis, juvenile parodontitis, rapid progressive parodontitis (RPP), adult parodontitis, refractory parodontitis, gingivitis, 30 halitosis, infections with *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida lusitanae*, *Candida dubliniensis* and cancer.



Bacteria can be located in gingival pockets which release the sulphur found in cysteine or methionine in the form of volatile sulphur compounds such as mercaptans or hydrogen sulphide. Dissimilation active sulphate-reducing bacteria are known, whose hydrogen sulphide formation is correlated with sulphate reduction. By use of the support materials according to the invention and application of the process according to the invention, the rate of formation of hydrogen sulphide and mercaptans, preferably methyl mercaptans, can be measured in gingival pockets. Moreover, the bacterial enzyme activities, preferably methionin- $\gamma$ -lyase, particularly preferably cysteine desulhydrase, which catalyse the formation of the volatile sulphur compounds, can be used as a measure of halitosis activity in gingival pockets. Moreover the presence of the bacteria responsible for the release, preferably fusobacteria, Porphyromonas, Veillonella, Clostridium and Treponema, can be determined with polyclonal antibodies and their subclasses or monoclonal antibodies.

The different forms of parodontitis are causally connected with infection by Actinobacillus actinomycetemcomitans, Bacterioides forsythus, Campylobacter rectus, Capnocytophage ochracea, Capnocytophage gingivalis, Eikenella corrodens, Fusobacterium nucleatum, Porphyromonas asaccharolyticus, Porphyromonas gingivalis, Prevotella dentalis, Prevotella intermedia, Prevotella nigrescens and Treponema denticola. By use of the support materials according to the invention and application of the process according to the invention, the presence and quantity of bacteria in the sulcus fluid can be determined. Specific polyclonal antibodies and their subclasses or monoclonal antibodies which are directed against surface antigens of these bacteria, for example fimbriae, extra-cellular polysaccharides and adhesins are suitable for this purpose.

By use of the support materials according to the invention and application of the process according to the invention, enzyme activities can be measured in the sulcus fluid, indicating the presence and metabolic activity of a bacterium or a group of the named bacteria. Trypsin-like protease activity, preferably dipeptidyl peptidase activity, particularly preferably Arg-Gingipain activity and

Lys-Gingipain activity, is used diagnostically. Synthetic peptides which contain at least one Arg radical (in P1 position) next to the detectable parting group can be used to determine Arg-Gingipain activity. Synthetic peptides which contain at least one Lys radical (in P1 position) next to the detectable parting group can be used for determining the Lys-Gingipain activity. Besides p-nitroaniline derivatives, for example N $\alpha$ -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide, and 2-naphthylamine-peptide derivatives, for example N $\alpha$ -benzoyl-DL-arginine- $\beta$ -naphthylamide, 6-aminoquinoline-peptide derivatives, rhodamine-peptide derivatives and coumarin-peptide derivative, for example 7-amido-4-methylcoumarin, such as N-t-Boc-Val-Pro-Arg-7-amido-4-methylcoumarin and 7-amino-4-chloromethylcoumarin, such as N-t-Boc-Val-Pro-Arg-7-amido-4-chloromethylcoumarin can be used as detectable parting groups.

By use of the support materials according to the invention and application of the process according to the invention the bacterial substances which lead to induction of cytokines can be diagnosed with polyclonal antibodies and their subclasses or monoclonal antibodies. Antibodies against lipopolysaccharides, lipoarabinomannan, peptidoglycans, teichoic acid derivatives, extra-cellular polysaccharides and lipid A are preferred.

By use of the support materials according to the invention and application of the process according to the invention the cytokine formation induced by parodontitis excitors can be diagnosed with polyclonal antibodies and their subclasses or monoclonal antibodies. Antibodies against the interleukines IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, tumour necrosis factor TNF $\alpha$ , interferons  $\alpha, \beta, \gamma$ , colony-forming factors M-CSF, growth factors EGF, TGF $\alpha$  and chemokines MCP can be used.

By use of the support materials according to the invention and application of the process according to the invention, the destruction of the parodontal tissue by the enzyme activity of alkaline phosphatase, arylsulphatase, aspartataminotransferase,  $\beta$ -glucuronidase, cathepsins (G, B, D), elastase, hyaluronidase, lactate-dehydrogenase, lysocyme, matrix metal proteinases

(collagenases, gelatinases), tissue inhibitor metal proteinases (TIMP), stomelysin, lactoferrin, tryptase and myeloperoxidase can be diagnosed.

By use of the support material according to the invention and application of the processes according to the invention the molecular markers for gingivitis can be diagnosed with polyclonal antibodies and their subclasses or monoclonal antibodies. These include cytokines, for example interleukines IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, TNF $\alpha$  and arachidonic acid derivatives, for example prostaglandin E<sub>2</sub>.

10

Caries is causally connected with infection by *Streptococcus salivarius salivarius*, *Streptococcus vestibularis*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus rattus*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus cricetus*, *Streptococcus downei*, *Streptococcus macacae*, *Streptococcus ferus*, *Streptococcus milleri*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus parasanguis*, *Streptococcus crista*, *Streptococcus mitior*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* ss *paracasei*, *Lactobacillus paracasei* ss *ramnosus*, *Lactobacillus paracasei* ss *tolerans*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii* ss *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* ss *delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii* ss *bulgaricus*, *Lactobacillus endocarditis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus pseudoplatarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces odontolyticus*, *Actinomyces actinomycetemcomitans*, *Eikenella*, *Branhamella catarrhalis*, *Veillonella alcalescens*, *Veillonella parvula*, *Actinomyces naeslundii*, *Rothia dentocariosa*. By use of the support materials according to the invention and application of the process according to the invention the presence and the amount of cariogenic bacteria can be diagnosed with polyclonal antibodies and their subclasses or monoclonal antibodies, which are directed against the different surface antigens of these bacteria, for example proteins, lipopolysaccharides, glycoproteins, fimbriae, extracellular polysaccharides,

30

adhesins, lipoteichoic acid derivatives, glucan-binding proteins, and collagen-binding proteins.

5 By use of the support materials according to the invention and application of the process according to the invention extra-cellular enzyme activity of cariogenic bacteria can be diagnosed, for example proteases, preferably glucosyltransferases, glucanase, fructosyltransferase, fructanase.

10 By use of the support materials according to the invention and application of the process according to the invention metabolic products of cariogenic bacteria can be diagnosed, for example butyric acid, formic acid, preferably acetic acid, propionic acid, and particularly preferably lactic acid. The acidification of the surrounding environment which accompanies acid release can in addition be detected using pH indicators, for example bromo phenol  
15 blue, Congo red, bromo cresol blue, preferably rhodol derivatives, particularly preferably Oregon green derivatives. As a result of the acidification of the pH in the surrounding environment, such as plaque, calcium ions are released from the hard dental substance. By use of the support materials according to the invention and application of the process according to the invention, this  
20 process can be diagnosed using calcium indicators, for example calcium crimson, preferably calcium green, calcium orange, and particularly preferably calcium Oregon green 488 BAPTA.

25 By use of the support materials according to the invention and application of the process according to the invention, the increase or decrease in the abovementioned marker compounds can be used as a measure of the healing process.

30 The list of the marker compounds is given by way of example and does not limit the invention.

It is surprising that in spite of the dynamic processes taking place in the oral cavity, which are subject to a constant exchange of fluid due to the secretions of the salivary glands and the sulcus fluid, sufficiently high concentrations of

marker compounds are obtained on the surfaces of the support materials according to the invention or in the support materials, which allow a safe diagnosis to be made within the framework of routine treatments.

5 It is advantageous that by using the support materials according to the invention or by application of the process according to the invention, an almost complete situation description of the oral cavity is possible without a large number of individual samples, as is archiving of the present clinical picture, with the use of addition-cross-linking silicon impression materials  
10 being of particular interest, as the impressions can be kept practically indefinitely. If necessary, for the purpose of archiving the present clinical picture, the impressions can also be recorded by means of photography, digital cameras, UV-VIS/fluorescence scanners and evaluated by means of image documentation software.

15

In addition it is advantageous that by using the support material according to the invention and application of the process according to the invention an almost complete situation description of the individual teeth is possible without a large number of individual samples, as is archiving of the present clinical  
20 picture. Besides occlusal chewing surfaces and vestibular, lingual, coronal, apical, cervical, gingival, incisal areas of a tooth, the interproximal areas between the teeth are also recorded by the marking definition of the support materials.

25 It is also advantageous that by use of the support materials according to the invention or the process according to the invention, fluid from the gingival pockets can if necessary be collected and taken for locus- and substance-specific diagnosis. An almost complete situation description of the individual parodontal pockets is thus possible without a large number of individual  
30 samples, as is archiving of the present clinical picture.

It is above all advantageous that the locus- and substance-specific intraoral diagnosis takes place in such a way that the diagnostically useful additives do not burden the patient because the emission of the diagnostically useful

additives is avoided. The diagnostically useful additives are not modification substances which modify the processes occurring intraorally. Repeated use of the locus- and substance-specific intraoral diagnosis to monitor the treatment process is thus made possible.

5

It is furthermore advantageous that by use of the support materials according to the invention or the process according to the invention the time-consuming cultivation or incubation of pathogenic microorganisms is dispensed with, and thus the risk connected with the multiplication of pathogenic germs is also minimised. A particularly great advantage of the method according to the invention is that detection also succeeds if the concentrations of the substances to be detected in the imaging material are very low.

10

In addition it is advantageous that the diagnosis result from the impression can if necessary be transferred to a positive impression. This is possible for example with plaster, hydrogels, model silicones or similar substances. Assignment of the diagnosis signals in the impression to individual teeth is thus facilitated.

15

With the support materials according to the invention direct locus- and substance-specific detection of microorganisms on the teeth also succeeds without having to cultivate or incubate the microorganisms adhering to the support material. This means that it is not necessary, for example, to add nutrients to the support material, as described in US-A-4 976 951.

20

25

Equally advantageous is the simplicity of the processes described, which, in the case of many diseases allows problem-free early recognition or early diagnosis at low cost, and without considerable additional expense to the therapist and the patient.

30

As support material, dental impression materials or films, each based on silicon, polyether-silicon, polyether, alginate or hydrocolloid can for example be considered. For some application areas, such as the diagnosis of caries, alginates, preferably without the addition of phosphates or pyrophosphates

are used. Equally suitable as support materials are all other known plastics, for example polyethylenes, polypropylenes, poly(meth)acrylates, polyurethanes, polycarbonates, polysulphide, polyvinylchlorides or rubber. Moreover, hydrogels, for example polyvinylpyrrolidone- or polyvinylalcohol-based, are suitable as support material. Also suitable for carrying out the process according to the invention are dental plaster preparations, non-curable plastic compositions such as kneading masses or solid dispersions in liquids, for example pastes and similar masses of silicon, waxes, gelatine, starch, fats and the above named support materials.

The basis of many impression materials is formed by addition-cross-linking or condensation-cross-linking silicones, polyether silicones or polyethers. These materials have been described extensively in the state of the art, so it is superfluous to go into them in more detail here. Addition- or condensation-cross-linking silicones are for example described in US-A-3 897 376, in EP-B-0 231 420 as well as in US-A-4 035 453 which is mentioned there on page 3, and also in EP-A-0 480 238 (see in particular page 2, lines 3-26) and in EP-B-0 268 347. The disclosure of these documents should be included here by means of reference. Polyether silicones are described for example in DE-A-37 41 575 as well as in DE-A-38 38 587, among others, the disclosure of which should also be included here. Polyethers are described for example in DE-B-17 45 810, DE-A-43 06 997, DE-A-40 93 555, DE-C-25 15 593, DE-A-197 19 438 and US-A-34 53 242, the disclosure of which should likewise be included here. Impression materials based on N-alkylaziridinopolyether are preferred.

Support materials based on polyether are particularly suitable. The compounds include for example the following components:

(A) 30 to 96.9999, preferably 40 to 88.99, particularly preferably 45 to 80.49 wt.-% of at least one N-alkylaziridinopolyether with a molecular mass in the range of 1,000 to 20,000 g/mol and an aziridino equivalent mass in the range of 500 to 8,000 g/equivalent.

- (B) 1 to 10, preferably 1 to 5, particularly preferably 1.5 to 3 wt.-% starter substances, which are suitable to effect the curing of the N-alkylaziridinopolyethers,
- (C) 1 to 50, preferably 5 to 45, particularly preferably 8 to 43 wt.-% organic diluting agents,
- (D) 1 to 50, preferably 5 to 40, particularly preferably 10 to 30 wt.-% modifiers, including fillers, dyes, pigments, thixotropes, flow improvers, polymeric thickeners, surfactants, fragrances, and flavourings,
- (E) 0.0001 to 10 wt.-%, preferably 0.01 to 1 wt.-% diagnostic additives.

Component (A) includes N-alkylaziridinopolyether, in which the polyether basic substances can be homopolymers of ethylene oxide, propylene oxide or tetrahydrofuran, statistic co- and terpolymers of the named monomers and/or block copolymers of ethylene oxide and propylene oxide.

Such starter substances according to component (B) are suitable for use in two-component impression materials, which facilitate curing of the mixed preparation into an elastic solid body within a period of 1 to 20 minutes, this solid body meeting the requirements of an elastic impression material according to DIN/EN 2482 and having a Shore A hardness (DIN 53505) of at least 20 after 24 hours storage time.

Many of the known starters can be used as starters of the catalyst components. Expedient use is made of such starters or starter systems which allow simple adjustment of the curing process, produce no side effects and make it possible to reproduce the mechanical properties at the required level.

In DE-C-914 325 the use of oxonium, ammonium and sulphonium salts as starter substances is suggested.

A summary representation of the starter substances used for the curing of N-alkylaziridino compounds is contained in O.C. DERMER, G. E. HAM, "Ethylenimines and other Aziridines" Academic Press (1969).



A large number of compound classes and compounds have accordingly proved to be suitable in principle as polymerisation triggers. In the practical application of the cationic polymerisation of aziridinopolyethers, it is however very difficult to adjust the desired setting process with a sufficiently long  
5 processing time and rapid final curing. This aim can be achieved by the use of special trialkylsulphonium salts as described for example in EP-A-0 110 429.

By using special trisalkylsulphonium salts, the criteria of the curing speed and the properties of the elastic solid body can in principle be achieved.

10.

In the patent application DE-A-100 18 918 starters are described which give the catalyst component only a low acid level and allow an easily adjustable, relatively long processing time after mixing of the basic components and catalyst components has been carried out.

15

Starter systems of this type are suitable for curing the base pastes at the necessary speed. By using these the desired properties of the elastic solid body can be achieved.

20

Patent application DE-A-199 42 459 describes elastomeric materials with improved catalyst components which are characterized by increased extensibility. According to this invention boric acid complexes are used as starters. These starters have proved their worth particularly for curing of N-alkylaziridinopolyethers.

25

As organic diluting agents, corresponding to component (C), polyetherpolyols, such as polypropylene glycols or mixed polyetherols with tetrahydrofurane and/or ethylene oxide and/or propylene oxide units, polyester polyols, such as polycaprolactondiacols and polycaprolactontriols, polycarbonate diols, aliphatic  
30 esters, oils, fats, waxes, aliphatic hydrocarbons, alicyclic hydrocarbons as well as mono- or polyfunctional esters of multivalent acids, such as phthalic acid or citric acid or esters or amides of alkylsulphonic acids and arylsulphonic acids are used.

The modifiers according to component (D) are mostly fine fillers, such as aluminosilicates, precipitation silicic acids, silica dust, wollastonite, mica dust and diatomaceous earth, as well as dyes and pigments, the addition of which allows better assessment of the mixture quality and reduces the danger of

5 confusion, thixotropes, such as finely dispersed silicic acids and other additives influencing flow behaviour, such as polymeric thickeners, and also surfactants for adjustment of the flow behaviour as well as fragrances and flavourings.

10 A further possible support material can also be a polymerisable liquid or a solution of a polymeric substance, which is sprayed or applied, for example painted, onto the places to be examined. Typically, this involves  
 15 nitrocellulose-based paints with a volatile solvent as well as optionally further auxiliaries which cure to form a solid layer which can be removed from the substrate after absorption of the marker compound. In general, all polymers can be used which can be dissolved in suitable slightly volatile solvents. The use of polyurethanes in acetone is for example known. Suitable film-forming systems are sufficiently known from paints and varnish chemistry.

20 Firstly, the support material according to the invention can intraorally, locus-specifically absorb the marker compound to be examined. The marker compound is detected, quantified or diagnostically evaluated on or in the support material locus- and substance-specifically in a subsequent procedure,  
 25 with the marker compound also being able to be formed only as the result of a catalytic, chemical, or biochemical reaction. The marker compound to be analysed can for example be locally fixed on or in the support material by means of ionic, polar, nonpolar or hydrophobic interactions. The formation of microstructures and/or micro-spaces in the support materials, for example in the form of foams, can support the absorption and fixing of the marker  
 30 compounds to be examined.

In a preferred embodiment, the support material contains at least one component or, to simplify the diagnostic procedure, all the necessary components of the diagnostic test system. These diagnostic additives can for

example be locally fixed on or in the support material by means of ionic, polar, nonpolar or hydrophobic interactions. A local fixing of diagnostic additives is also made possible by the fact that the diagnostic additives are first fixed on high-molecular carriers and then kneaded into the support material. By this

5 means the diffusion movement of the diagnostic additives in the support material is controlled. The formation of microstructures and/or micro-spaces in the support materials, for example in the form of foams, can support the absorption and fixing of the components. The components can be freely available in the support materials according to the invention, or be present in  
10 another phase.

The support materials according to the invention contain 0.0001 to 10 wt.-%, preferably 0.01 to 1 wt.-% diagnostic additives, however at least so many additives that the desired effect can be observed. In the case of application of  
15 the process according to the invention, diagnostic additives have to be applied to the support materials in such a quantity that the desired effect can be observed.

Desired effects can all be observable signals. These include, for example,  
20 colour signals, for example fluorescent, UV, VIS, phosphorescent or luminescent signals, which if necessary have to be detected with special equipment. Likewise, application of the process according to the invention can produce signals which can be observed by means of thermography,  
spectroscopy, chromatography, or by analysis of changes in the topography  
25 of the support materials.

Examples of diagnostic additives are, without meaning the following list to be understood as limiting the present invention:

- 30
- dye indicators, for example pH indicators, such as bromo phenol blue, Congo red, bromo cresol green, Oregon green derivatives, rhodol derivatives, redox indicators, such as methylene blue, 5-cyano-2,3-ditolyltetrazolium chloride (CTC), 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium chloride (INT), 8-

dimethylamino-2,3-benzophenoxazine (Meldola's blue), 1-methoxyphenazine methosulphate (MPMS), 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulphophenyl)tetrazolium (MTS), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 3,3'-(3,3'-dimethoxy-4,4'-biphenylene)-bis[2-(4-nitrophenyl-5-phenyl)]-2H-tetrazolium chloride (NBT), nitrotetrazolium violet (NTV), phenazinmethosulphate (PMS), sodium-3'-[1-[(phenylamino)carbonyl]-3,4-tetrazolium]bis(4-methoxy-6-nitro)benzenesulphonic acid (XTT),

phenazinethosulphate (PES), WST-1)

- Fluorescence indicators, for example Oregon green 488 BAPTA, calcium green, calcium orange, calcium crimson,
- Chemoluminescence indicators,
- Vitality indicators, for example 5-bromo-2'-deoxyuridine,
- Other dye indicators, for example p-nitroaniline derivatives, 2-naphthylamine derivatives, 7-amino-4-methylcoumarin derivatives, 7-amino-4-chloromethylcoumarin derivatives, 6-aminoquinoline derivatives, rhodamine derivatives, 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), monobrombimane derivatives, tetramethylrhodamine derivatives, eosine derivatives, erythrosine derivatives, Texas red derivatives, coumarin derivatives, pyridyloxazole derivatives, benzofurazan derivatives, naphthalene derivatives, dansyl cysteines, dansyl derivatives, aziridine derivatives, pyrene derivatives, Coomassie blue)

Moreover, the indicator substances can for example be covalently bound to enzymes, proteins, glycoproteins, lipopolysaccharides, polysaccharides, polyclonal and monoclonal antibodies, DNA, RNA cell organelles or microorganisms.

By diagnostic additives are also meant antibodies which are directed against marker compounds, such as polyclonal antibodies and their subclasses, and monoclonal antibodies. Moreover, the antibodies can be covalently bound for

example to enzymes, proteins, glycoproteins, lipopolysaccharides, polysaccharides, DNA, RNA, cell organelles, microorganisms or other support materials.

5 Diagnostic additives can be enzymes of the following classes, the following list being by way of example, and not limiting the invention:

- 10       ◦ Oxidoreductases and their subclasses, for example dehydrogenases, such as lactate dehydrogenase, oxidases, peroxidases, reductases, monooxygenases, dioxygenases;
- transferases and their subclasses, for example C<sub>1</sub>-transferases, glycosyl transferases, such as glucosyltransferases, fructosyltransferases, aminotransferases, phospho-transferases;
- 15       ◦ hydrolases and their subclasses, for example esterases, glycosidases such as glucanase, fructanase, peptidases, for example dipeptidylpeptidases, Arg-gingipain, Lys-gingipain, collagenases, gelatinases, cathepsins, elastases, amidases,
- Lyases and their subclasses, for example C-C-lyases, C-O-lyases, C-N-lyases, C-S-lyases,
- 20       ◦ Isomerases and their subclasses, for example epimerases, cis-trans-isomerases, intramolecular transferases;
- Ligases and their subclasses, for example C-C-ligases, C-O-ligases, C-N-ligases, C-S-ligases.

25 2000 different enzymes are known today. A system has been developed for their classification which takes effect- and substrate-specificity into account. According to this, specific substrates and/or coenzymes (NAD(P), NAD(P)H, FAD, FMN, liponamide, ubiquinon, heme, ATP, ADP, AMP, GTP, GDP, GMP, UTP, UDP, UMP, CTP, CDP, CMP, coenzyme A, thiamindiphosphate,

30 pyridoxalphosphate, biotin and tetrahydrofolate belong to each enzyme. These specific substrates and/or coenzymes have to be present as diagnostic additives if for example one or more enzymes serve as a marker substance. Conversely, it is of course true that specific enzymes can be used as

diagnostic additives if specific substrates, for example sugar phosphates, lactic acid/lactate, pyruvate, acetic acid/acetate, propionic acid/propionate, formic acid/formiate, peptides and synthetic peptides serve as marker substances.

5

In addition the enzymes can be covalently bound to the support material.

Diagnostic additives can also be substances which have to be present concomitantly, in order to be able to diagnose the marker substances. Such substances include:

10

- Buffers, for example sodium phosphate, sodium hydrogen phosphate, sodium dihydrogen phosphate, potassium phosphate, potassium hydrogen phosphate, potassium dihydrogen phosphate, sodium pyrophosphate, sodium carbonate, potassium carbonate, sodium hydrogen carbonate, potassium hydrogen carbonate, sodium tetraborate, acetic acid/acetate, citric acid/citrate, diethylbarbituric acid, tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS), glycine, glycylglycine, N-(2-acetamido)-2-aminoethane sulphonic acid (ACES), N-(2-acetamido)iminodiacetate (ADA), N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethane sulphonic acid (BES), N,N-bis(2-hydroxyethyl)glycine (BICINE), 2,2-bis-(hydroxyethyl)-iminotris(hydroxymethyl)methane (BIS-TRIS), 2-(cyclohexylamino)ethane sulphonic acid (CHES), 2-[4-(2-hydroxyethyl-1-piperazine)]ethane sulphonic acid (HEPES), 3-[4-(2-hydroxyethyl-1-piperaziny)]propane sulphonic acid (HEPPS), 2-morpholinoethane sulphonic acid (MES), 3-morpholinopropane sulphonic acid (MOPS), piperazine-1,4-bis(2-ethane sulphonic acid (PIPES), N-[tris(hydroxymethyl)-methyl]-2-aminoethane sulphonic acid (TES), N-[tris(hydroxymethyl)-methyl]-glycine (TRICINE);
- Acids, for example sulphuric acid, sulphurous acid, phosphoric acid, hydrochloric acid, acetic acid, nitric acid;
- Bases, for example sodium hydroxide, potassium hydroxide, lithium hydroxide, ammonia, calcium hydroxide, magnesium oxide;

15

20

25

30

- Solvents, for example water, methanol, ethanol, isopropanol, propanol, glycerine, dimethylsulphoxide, tetrahydrofuran, acetone, butanone, cyclohexane, toluene, methylene chloride, chloroform, alkanes, acetic acid ethyl esters;

- 5
- Salts, for example magnesium chloride, magnesium sulphate, magnesium nitrate, calcium chloride, calcium sulphate, calcium nitrate, ferric (III) chloride, ferric (II) chloride, zinc chloride, zinc sulphate, nickel chloride, manganese chloride, ammonium sulphate, sodium sulphate, sodium chloride, potassium chloride, sodium phosphates, potassium
- 10
- phosphates;

- Other substances, for example glutathione, bovine serum albumin, sucrose, glucose, fructose, trehalose, polyethylene glycol, polyvinylpyrrolidone, hydrogen peroxide.

15 In a special embodiment of the invention, the diagnostic additives can be present in micro-encapsulated form. A number of molecules of diagnostic additives can be included in one microcapsule. The potentiating effect that occurs when micro-encapsulated diagnostic substances are used is a particular advantage.

20

Generally, when using multicomponent diagnostic systems according to the invention, i.e. systems in which the components necessary for detection are stored in several components, the individual components can be present separated from one another, but in each case enclosed in microcapsules, or

25 even partly micro-encapsulated and partly free. Of course it also possible, with diagnosis systems involving more than two components, for at least two components in each case to be micro-encapsulated and for at least one other component to be kept available free in the support material. In each case it is essential only that a reaction of the diagnostic additives for the desired end

30 product is prevented by keeping the individual components separate until one reaction partner is released by destruction of the microcapsule wall.

As impression materials are normally available as two components, it can be advantageous to keep different components of the active ingredients in different components of the impression materials, namely the base and the catalyst paste, microcapsulated or free.

5

When choosing suitable support materials care must generally be taken that these are compatible with the diagnostic substances. For example when using fluorescent dyes, naturally the support materials must not contain components which are themselves fluorescent in the relevant wave length range. The requirement for inert support materials for diagnostic purposes is self-evident to the person skilled in the art and can be borne in mind by the person skilled in the art without problems.

10

The invention is explained below in more detail by means of examples, without these limiting it in any way.

15

#### **Application example 1**

##### **Detection of Arg-gingipain via a polyether impression material**

20

A base paste was prepared in a standard laboratory three-fingered kneader, 53.2 parts by weight of an aziridinopolyether obtained according to Example 12 of DE-PS-17 45 810 being mixed with 18.1 g of a hydrogenated palm oil and 6.4 parts by weight dibenzyl toluene for the sake of homogeneity. This mass was combined with 11.8 parts of a copolymer of ethylene oxide and tetramethylene oxide units of an average molar mass of 6500, as well as 0.1 parts laurylimidazol and 5.0 parts of a block copolymer of ethylene oxide and propylene oxide units with an average molecular mass of 3500. This mass was then mixed with 5.3 parts by weight diatomaceous earth.

25

30

A catalyst paste was mixed by homogenisation of 33.8 parts by weight acetyltributylcitrate with 14.1 parts ethylene oxide-propylene oxide block copolymer and 19.0 parts of a sulphonium salt which was obtained according to Example 31 of DE-PS-25 15 593. This mass was combined with 11 parts



diatomaceous earth and 20.5 parts pyrogenic silicic acid as well as 1 part titanium dioxide. Then 0.7 g tris(hydroxymethyl)aminomethane, 0.8 g glycylglycine and 200 µg N-t-Boc-Val-Pro-Arg-7-amido-4-methyl-coumarin were added as buffers.

5

Base and catalyst pastes were mixed in a volume ratio 5:1 and cured after approx. 8 minutes to produce a homogenous rubber. Doping of the surface of this rubber during the setting period with 2 µl Arg-gingipain-containing solution (original solution: 0.5 mg/ml Arg-gingipain in 200 mM

10 tris(hydroxymethyl)aminomethane pH 7.6) resulted after a few minutes in an intense blue fluorescence emission at this point, at an excitation wave length of 360 nm.

15

### **Application example 2**

#### **Detection of Arg-gingipain on alginate test pieces**

20 ml solution containing 0.12 g tris(hydroxymethyl)aminomethane, 100 µg N-t-Boc-Val-Pro-Arg-7-amido-4-methylcoumarin, pH 7.6 were added to 10 g

20 alginate (Palgat Plus Quick, ESPE Dental AG) and kneaded with a broad plastic spatula to produce a homogenous paste within 1 minute. During the setting period the alginate test piece was doped with 2 µl Arg-gingipain-containing solution (original solution: 0.5 mg/ml Arg-gingipain in 200 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane, pH 7.6). After 5 minutes, an intense blue

25 fluorescent emission could be observed at this point, at an excitation wave length of 360 nm.

### **Application example 3**

30 **Detection of Arg-gingipain via an alginate impression material in gingival pockets**

40 ml solution containing 0.24 g tris(hydroxymethyl)aminomethane, 0.26 g glycylglycin, 200 µm N-t-Boc-Pro-Arg-7-amido-4-methylcoumarin was added

to 20 g alginate (Palgat Plus Quick, ESPE Dental AG) and kneaded with a broad plastic spatula to produce a homogenous mass within 1 minute. The alginate mass was placed in a commercially available impression tray and placed on the upper and lower jaw of a parodontitis patient for 5 minutes.

- 5 Intense blue fluorescence emissions could be observed on individual gingival pocket edges at an excitation wave length of 360 nm.

#### **Application example 4**

##### **10 Detection of lactic acid on alginate test pieces**

10 ml solution containing 0.065 g glycylglycin, 0.06 g  
 tris(hydroxymethyl)aminomethane, 9 mg NAD, 0.23 mg phenazine  
 methosulphate, 0.75 mg 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium  
 15 bromide (MTT), and 463 units lactate dehydrogenase from pig's heart was  
 added to 5 g alginate and kneaded with a broad spatula to produce a  
 homogenous mass within 1 minute. The alginate test pieces were doped with  
 5 µl of a 10 mM calactate solution in 100 mM tris(hydroxymethyl)amino-  
 methane, pH 9.0. After 4 minutes the development of a blue coloration could  
 20 be observed at the doping point.

#### **Application example 5**

##### **25 Determination of lactic acid formation on teeth by means of an alginate impression material**

40 ml solution containing 0.26 g glycylglycin, 0.24 g  
 tris(hydroxymethyl)aminomethane, 36 mg NAD, 0.9 mg phenazine  
 methosulphate, 3 mg 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium  
 30 bromide (MTT), and 1850 units lactate dehydrogenase from pig's heart was  
 added to 20 g alginate and kneaded with a broad spatula to produce a  
 homogenous mass within 1 minute. The alginate mass was placed in a  
 commercially available impression tray and placed on the upper and lower jaw  
 of a patient. The patient was supposed to have cleaned his teeth beforehand,

rinsing with a 1% sucrose solution. After 4 minutes the impression tray was removed. Places where there was lactic acid formation could be identified from the blue coloration developing.

Claims

1. Deformable, curable or film-forming support material, characterized in that it contains diagnostically useful additives for locus-specific and substance-specific intraoral diagnosis, which lead to a diagnostic result without a cultivation step.
2. Support material according to Claim 1, characterized in that it contains diagnostically useful additives for intraoral locus-specific detection of pathogenic substances and/or microorganisms or for intraoral locus-specific detection of substances that indicate mouth diseases or healing processes.
3. Support material according to any one of Claims 1 or 2, characterized in that the diagnostically useful additives are present in micro-encapsulated form.
4. Support material according to any one of Claims 1 to 3, characterized in that at least enough diagnostic additives are contained to enable a diagnostic signal to be observed.
5. Support material according to any one of Claims 1 to 4, characterized in that the diagnostic additives are contained in a quantity of 0.0001 to 10 wt.-%, preferably 0.01 to 1 wt.-%.
6. Support material for use according to any one of Claims 1 to 5, characterized in that it is selected from one of the following groups:
  - (i) impression materials or films based on silicon, polyether-silicon, polyether, alginate or hydrocolloid,
  - (ii) plastics from the group polyethylenes, polypropylenes, poly(meth)acrylates, polyurethanes, polycarbonates, polysulphide, polyvinylchlorides or rubber,

- (iii) hydrogels based on polyvinylpyrrolidone or polyvinylalcohol, or
- (iv) dental plaster preparations.

5

7. Support material according to Claim 6, characterized in that it is an impression material based on N-alkylaziridinopolyether.
8. Support material according to Claim 7, characterized in that it includes:
  - 10 (A) 30 to 96.9999 wt.-% of at least one N-alkylaziridinopolyether with a molecular mass in the range of 1,000 to 20,000 g/mol and an aziridino equivalent mass in the range of 500 to 8,000 g/equivalent.
  - (B) 1 to 10 wt.-% starter substances, which are suitable to effect the curing of the N-alkylaziridinopolyethers,
  - 15 (C) 1 to 50 wt.-% organic diluting agents,
  - (D) 1 to 50 wt.-% modifiers, including fillers, dyes, pigments, thixotropes, flow improvers, polymeric thickeners, surfactants, fragrances, and flavourings,
  - (E) 0.0001 to 10 wt.-% diagnostic additives.
- 20 9. Process for the preparation of images for intraoral locus- and substance-specific diagnostic purposes, characterized in that diagnostically useful additives are applied to deformable, curable or film-forming support materials containing no diagnostically useful additives, in such a quantity
- 25 that a diagnostic signal can be observed, with the additives leading to a diagnostic result without a cultivation step.
10. Process according to Claim 9, characterized in that diagnostically useful additives are applied to deformable, curable or film-forming support
- 30 materials containing no diagnostically useful additives, in such a quantity that a diagnostic signal in the form of the intraoral locus- and substance-specific detection of pathogenic substances and/or of microorganisms or in the form of intraoral locus- and substance-specific detection of

substances which indicate mouth diseases or healing processes can be observed.

- 5
11. Process according to any one of Claims 9 or 10, characterized in that the diagnostically useful additives are present in micro-encapsulated form.
12. Process according to any one of Claims 9 to 11, characterized in that the diagnostically useful additives are used in a quantity of 0.0001 to 10 wt.-%, preferably 0.01 to 1 wt.-%.
- 10
13. Process according to any one of Claims 9 to 12, characterized in that the support material is selected from one of the following groups:
- 15
- (i) impression materials or films based on silicon, polyether-silicon, polyether, alginate or hydrocolloid,
  - (ii) plastics from the group polyethylenes, polypropylenes, poly(meth)acrylates, polyurethanes, polycarbonates, polysulphide, polyvinylchlorides or rubber.
  - (iii) hydrogels based on polyvinylpyrrolidone or polyvinylalcohol, or
  - 20 (iv) dental plaster preparations.
14. Process according to Claim 13, characterized in that an impression material based on N-alkylaziridinopolyether is selected as support material.
- 25
15. Method according to Claim 14, characterized in that the support material includes:
- 30
- (A) 30 to 96.9999 wt.-% of at least one N-alkylaziridinopolyether with a molecular mass in the range of 1,000 to 20,000 g/mol and an aziridino equivalent mass in the range of 500 to 8,000 g/equivalent.
  - (B) 1 to 10 wt.-% starter substances, which are suitable to effect the curing of the N-alkylaziridinopolyethers,
  - (C) 1 to 50 wt.-% organic diluting agents,

- (D) 1 to 50 wt.-% modifiers, including fillers, dyes, pigments, thixotropes, flow improvers, polymeric thickeners, surfactants, fragrances, and flavourings,
- (E) 0.0001 to 10 wt.-% diagnostic additives.

5

16. Process for simultaneous multiple as well as locus- and substance-specific intraoral investigation, including the steps: Taking of impression with deformable, curable or film-forming support material, which contains diagnostically effective additives, and if necessary application of further diagnostically effective additives, or taking of impression with deformable, curable or film-forming support material, which contains no diagnostically effective additives, and application of diagnostically effective additives.

10

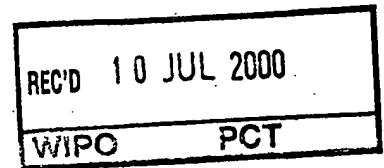
AbstractSupport materials and imaging method for intraoral diagnostic purposes

The invention relates to deformable, curable or film-forming support materials  
5 which contain diagnostically useful additives for locus- and substance-specific  
intraoral diagnostics, and processes for the preparation of images for  
intraoral locus- and substance-specific diagnostic purposes, in which  
diagnostically useful additives are applied to deformable, curable or film-  
forming support materials containing no diagnostically useful additives, in  
10 such a quantity that a diagnostic signal can be observed, the diagnostic result  
being obtained without a cultivation step.



New Claim 16

16. Process for simultaneous multiple as well as locus- and substance-specific intraoral investigation, including the steps: Taking of impression with deformable, curable or film-forming support material, which contains diagnostically effective additives, and if necessary application of further diagnostically effective additives, or taking of impression with deformable, curable or film-forming support material, which contains no diagnostically effective additives, and application of diagnostically effective additives, the diagnostic additives leading to a diagnostic result without a cultivation step.



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

4

EP 00/05418

(EJKU)

**Aktenzeichen:** 199 26 728.6  
**Anmeldetag:** 11. Juni 1999  
**Anmelder/Inhaber:** ESPE Dental AG, Seefeld, Oberbay/DE  
**Bezeichnung:** Trägermaterialien und Abbildungsverfahren für  
intraorale Diagnosezwecke  
**IPC:** A 61 K, G 01 N

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Anmeldung.**

München, den 16. Juni 2000  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Brand

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

Postanschrift / Postal Address  
Postfach 86 01 09  
D-81628 München

11. Juni 1999

31734/ACI/DE

ESPE Dental AG  
ESPE Platz  
D-82229 Seefeld  
BR. Deutschland

---

Trägermaterialien und Abbildungsverfahren für intraorale Diagnosezwecke

---

Die Erfindung betrifft verformbare, härtbare oder filmbildende Trägermaterialien für die intraorale Diagnostik, welche diagnostisch nutzbare Zusatzstoffe enthalten. Ferner betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung von Abbildungen für intraorale orts- und stoffspezifische Diagnosezwecke sowie

5 Verfahren für die multiple sowie orts- und stoffspezifische Befunderhebung unter Verwendung der diagnostisch nutzbare Zusatzstoffe enthaltenden härtbaren oder filmbildenden Trägermaterialien. Derartige Zusatzstoffe ermöglichen dem Fachmann die Herstellung von Abbildungen für den intraoral orts- und

stoffspezifischen Nachweis von pathogenen Substanzen und/oder von Mikroorganismen oder zum intraoral orts- und stoffspezifischen Nachweis von Substanzen, die auf Munderkrankungen oder Heilungsprozesse hinweisen.

- 5 Insbesondere betrifft die Erfindung dentale Abformmaterialien für die intraorale Diagnostik, welche diagnostisch nutzbare Zusatzstoffe enthalten, sowie ein Verfahren zum Aufbringen diagnostisch nutzbarer Zusatzstoffe auf ausgehärtete Abformmassen, wobei die diagnostisch wirksamen Zusatzstoffe zum intraoral orts- und stoffspezifischen Nachweis von pathogenen Substanzen und/oder von
- 10 Mikroorganismen oder zum intraoral orts- und stoffspezifischen Nachweis von Substanzen, die auf Munderkrankungen oder Heilungsprozessen hinweisen, geeignet sind.

- Ebenso betrifft die Erfindung verformbare oder härtbare oder filmbildende
- 15 Trägermaterialien, insbesondere dentale Abformmaterialien, die intraorale Stoffe ortspezifisch aufnehmen können, wobei diese aufgenommenen intraoralen Stoffe es dem Fachmann erlauben, durch Aufbringen diagnostisch wirksamer Zusatzstoffe auf die Trägermaterialien Testverfahren durchzuführen, die zum intraoral orts- und stoffspezifischen Nachweis pathogener Substanzen und/oder
- 20 von Mikroorganismen oder die zum intraoral orts- und stoffspezifischen Nachweis von Substanzen, die auf Munderkrankungen oder Heilungsprozessen hinweisen, geeignet sind.

- Der orts- und stoffspezifische Nachweis von Substanzen im Mundmilieu ist ein
- 25 seit langem bearbeitetes Problem. Dem Fachmann sind Single-Site-Tests bekannt (z.B. EP-A-0 304 871), die alle darauf beruhen, daß von definierten Punkten im Mundraum, beispielsweise Zahnfleischtaschen, Zahnoberflächen oder Zahnwurzelkanälen einzelne Proben genommen werden. Die anschließende Analyse dieser Proben erfolgt je nach Fragestellung mit den unterschiedlichsten
- 30 Methoden, wobei vier generelle Ansätze zu unterscheiden sind: .

10

15

20

30

Die immunologischen Methoden gemäß Absatz 2 sind im Vergleich zu den Bebrütungsverfahren gemäß Absatz 1 spezifischer, schneller und preisgünstiger, haben aber deutliche Schwächen in der Reproduzierbarkeit, die unter anderem durch die Probennahme bedingt werden. Beispielsweise befinden sich in einem Plaquebereich nicht nur vitale, sondern auch erhebliche Mengen abgestorbener Mikroorganismen. Je nach Probennahme kann das Verhältnis zwischen toten und vitalen Mikroorganismen unterschiedlich sein. Da die Antikörper nicht zwischen vitalen und toten Mikroorganismen unterscheiden können, ergibt sich eine unvorhersagbare Schwankungsbreite in der Ableitung des vorhandenen pathogenen Potentials der evaluierten Mikroorganismen (Aass, A.M.; Preus, H.R., Zambon, J.J., Gjermo, P. Scand J. Dent Res (1994) 102, 355 - 360).

3. Die Methode mit der höchsten Sensitivität beruht auf der Poly-Chain-Reaction-Technologie (PCR). Geringste Mengen Mikroorganismen können mit hoher Spezifität nachgewiesen werden. Allerdings ist die PCR-Technologie zeitaufwendig, komplex, kostenintensiv und in der Beherrschung nicht trivial (Rupf, S.; Kneist, S.; Merte, K.; Eschrich, K. Eur. J. Oral. Sci (1999) 107, 75 - 81).

4. Es wurden ferner einige Methoden beschrieben, die biochemische Marker nutzen, um Munderkrankungen zu diagnostizieren. Eine Übersicht bietet der Beitrag von J. Meyle, Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift (1999) 54, 73-77). Die Aussagekraft der einzelnen biochemischen Marker muß differenziert unter Berücksichtigung der klinischen Studien bewertet werden und bleibt dem Fachmann vorbehalten. Hervorzuheben ist, daß die Bestimmung der biochemischen Marker mittels Single-Site-Methoden erfolgt. Beispielhaft wird auf die Patentschrift WO-98/21583 hingewiesen. Die hier benötigten Hilfswerkzeuge zeichnen sich dadurch aus, daß sie die zu untersuchenden Proben binden (WO-91/14000, EP-A-0 304 871, US-A-5 725 373). Für jede Probenstelle muß jeweils ein Hilfswerkzeug eingesetzt und individuell analysiert werden.

Prinzipiell haben alle aus dem Stand der Technik bekannten Single-Site-Methoden den entscheidenden Nachteil, daß eine näherungsweise vollständige Situationsbeschreibung im Mundraum nur mit einer hohen Zahl von Einzelproben gewonnen werden kann. Zur Probennahme werden häufig Papierspitzen verwendet, die in Zahnfleischtaschen oder Wurzelkanäle eingeführt werden (US-A-5 725 373, EP-A-0 304 871).

Es ist bekannt, daß die Parodontitisaktivität von Zahnfleischtasche zu Zahnfleischtasche in einem Patienten sehr unterschiedlich sein kann, obwohl sich die Parodontitiserreger ubiquitär in den Zahnfleischtaschen befinden. Für eine Befunderhebung müssen deshalb weit mehr als 25 Einzelproben genommen und untersucht werden, ohne sicherstellen zu können, daß nicht der eine oder andere Parodontitisherd unberücksichtigt bleibt.

Hieraus wird prinzipiell einsichtig, daß punktuelle Bestandsaufnahmen nur unbefriedigende Situationsbeschreibungen des Mundraumes zulassen. Der hohe Zeit- und Kostenaufwand der Single-Site-Techniken ist damit nur bedingt zu rechtfertigen. Single-Site-Techniken haben sich daher in der Diagnostik des Mundraumes nicht in der breiten Anwendung durchgesetzt.

Es besteht daher seit langem ein dringendes Bedürfnis, ein einfaches und kostengünstiges Verfahren zur gleichzeitigen multiplen sowie orts- und stoffspezifischen intraoralen Befunderhebung im Mundraum zur Verfügung zu haben.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung von Mitteln und Methoden zum intraoral orts- und stoffspezifischen sowie gleichzeitig multiplen Nachweis pathogener Substanzen und/oder von Mikroorganismen oder zum intraoral orts- und stoffspezifischen Nachweis von Substanzen, die auf Munderkrankungen oder Heilungsprozesse hinweisen.

Im Laufe der Beschreibung der Erfindung sind unter den nachzuweisenden pathogenen Substanzen und/oder Mikroorganismen oder Substanzen, die auf Munderkrankungen oder Heilungsprozessen hinweisen, beispielsweise nachfolgend aufgeführte zu verstehen:

5

1. Stoffwechselprodukte von Bakterien, Viren oder Pilzen, beispielsweise Antigene, Lipide, Proteine, Peptide, Polysaccharide, DNA, RNA, Zucker, Aminosäuren, Carbonsäuren, beispielsweise Milchsäure und Propionsäure, sowie andere niedermolekulare, anionische, kationische oder neutrale Substanzen sowie deren Kombinationen, die sich beispielsweise aus ionischen, polaren, unpolaren, hydrophoben, kovalenten oder adhäsiven Wechselwirkungen ergeben.

10

2. Oberflächenstrukturen von Bakterien, Viren oder Pilzen, bestehend beispielsweise aus Antigenen, Lipiden, Proteinen, Peptiden, Polysacchariden, DNA, RNA, Zuckern, Aminosäuren oder anderen niedermolekularen, anionischen, kationischen oder neutralen Substanzen sowie deren Kombinationen, die sich beispielsweise aus ionischen, polaren, unpolaren, hydrophoben, kovalenten oder adhäsiven Wechselwirkungen ergeben.

15

20

3. Humane bzw. tierische Substanzen, die als Antwort auf Infektionen durch Bakterien, Viren oder Pilze gebildet werden, bestehend beispielsweise aus Antikörpern, Antigenen, Lipiden, Proteinen, Peptiden, Polysacchariden, DNA, RNA, Zuckern, Aminosäuren oder anderen niedermolekularen, anionischen, kationischen oder neutralen Substanzen sowie deren Kombinationen, die sich beispielsweise aus ionischen, polaren, unpolaren, hydrophoben, kovalenten oder adhäsiven Wechselwirkungen ergeben.

25

4. Humane bzw. tierische Substanzen, die auf Munderkrankungen hinweisen, die nicht *a priori* auf eine Infektion durch Bakterien, Viren oder Pilze beruhen (beispielsweise Krebserkrankungen), bestehend beispielsweise aus Antikörpern, Antigenen, Lipiden, Proteinen, Peptiden, Polysacchariden, DNA,

30



RNA, Zuckern, Aminosäuren oder anderen niedermolekularen, anionischen, kationischen oder neutralen Substanzen sowie deren Kombinationen, die sich beispielsweise aus ionischen, polaren, unpolaren, hydrophoben, kovalenten oder adhäsiven Wechselwirkungen ergeben.

5

5. Substanzen, die sich in Strukturen befinden, die als die Folge von oder die Voraussetzung für die Entstehung von Munderkrankungen, beispielsweise Plaque oder Biofilm, bekannt sind, bestehend beispielsweise aus Antikörpern, Antigenen, Lipiden, Proteinen, Peptiden, Polysacchariden, DNA, RNA, Zuckern, Aminosäuren oder anderen niedermolekularen, anionischen, kationischen oder neutralen Substanzen sowie deren Kombinationen, die sich beispielsweise aus ionischen, polaren, unpolaren, hydrophoben, kovalenten oder adhäsiven Wechselwirkungen ergeben.

10

6. Substanzen die auf laufende Heilungsprozesse hinweisen, die als die Folge von Munderkrankungen oder Verletzungen, beispielsweise Gewebe und/oder Knochenregeneration, bekannt sind, bestehend beispielsweise aus Antikörpern, Antigenen, Lipiden, Proteinen, Peptiden, Polysacchariden, DNA, RNA, Zuckern, Aminosäuren oder anderen niedermolekularen, anionischen, kationischen oder neutralen Substanzen sowie deren Kombinationen, die sich beispielsweise aus ionischen, polaren, unpolaren, hydrophoben, kovalenten oder adhäsiven Wechselwirkungen ergeben.

20

Die vorstehend aufgeführten Substanzen stehen exemplarisch für solche Substanzen, die alleine oder in Kombination für diagnostische Zwecke intraoraler Erkrankungen genutzt werden können und werden nachfolgend auch als Marker-Verbindungen bezeichnet.

25

Erfindungsgemäß wird die beschriebene Aufgabe gelöst durch verformbare, härtbare oder filmbildende Trägermaterialien, welche dadurch gekennzeichnet sind, daß sie diagnostisch nutzbare Zusatzstoffe für die orts- und stoffspezifische intraorale Diagnose enthalten, sowie durch Verfahren zur Herstellung von

30

Abbildungen für intraorale orts- und stoffspezifische Diagnosezwecke, welche dadurch gekennzeichnet sind, daß diagnostisch nutzbare Zusatzstoffe auf verformbare, härtbare oder filmbildende Trägermaterialien, die keine diagnostisch nutzbaren Zusatzstoffe enthalten, in einer solchen Menge aufgetragen werden, daß ein diagnostisches Signal wahrgenommen werden kann, und durch Verfahren für die gleichzeitige multiple sowie orts- und stoffspezifische intraorale Befunderhebung, umfassend die Schritte: Abdrucknahme mit verformbarem, härtbarem oder filmbildendem Trägermaterial, das diagnostisch wirksame Zusatzstoffe enthält, und gegebenenfalls Auftragen weiterer diagnostisch wirksamer Zusatzstoffe, oder Abdrucknahme mit verformbarem, härtbarem oder filmbildendem Trägermaterial, das keine diagnostisch wirksamen Zusatzstoffe enthält, und Auftragen diagnostisch wirksamer Zusatzstoffe.

Die diagnostisch nutzbaren Zusatzstoffe erlauben dem Fachmann die Durchführung diagnostischer Testverfahren, die zum intraoralen orts- und stoffspezifischen Nachweis pathogener Substanzen und/oder von Mikroorganismen oder die zum intraoral orts- und stoffspezifischen Nachweis von Substanzen, die auf Munderkrankungen oder Heilungsprozesse hinweisen, geeignet sind.

Überraschend ist, daß trotz der ablaufenden dynamischen Prozesse in der Mundhöhle, die einem ständigen Flüssigkeitsaustausch durch die Sekrete der Speicheldrüsen und der Sulkusflüssigkeit unterliegt, ausreichend hohe Konzentrationen von Marker-Verbindungen auf den Oberflächen der erfindungsgemäßen Trägermaterialien oder in den Trägermaterialien erhalten werden, die es gestatten, eine sichere Diagnose auch im Rahmen von Routinebehandlungen zu realisieren.

Vorteilhaft ist es, daß durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Trägermaterialien oder durch den Einsatz des erfindungsgemäßen Verfahrens eine nahezu komplette Situationsbeschreibung des Mundraumes, unter Verzicht einer großen Anzahl von Einzelproben, sowie eine Archivierung des momentanen

Krankheitsbildes möglich ist. Hierbei ist besonders die Verwendung von additionsvernetzenden Silikonabformmaterialien von Interesse, da die Abdrücke praktisch unbegrenzt haltbar sind.

- 5    Vorteilhaft ist es außerdem, daß durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Trägermaterialien und die Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens eine nahezu komplette Situationsbeschreibung der einzelnen Zähne, unter Verzicht einer großen Anzahl von Einzelproben, sowie eine Archivierung des momentanen Krankheitsbildes möglich ist. Neben okklusalen Kauflächen und vestibulären, 10 lingualen, koronalen, apikalen, zervikalen, gingivalen, inzistalen Bereichen eines Zahnes werden durch die Zeichnungsschärfen der Trägermaterialien auch die interproximalen Bereiche zwischen den Zähnen erfaßt.

- Vorteilhaft ist es auch, daß durch die Anwendung der erfindungsgemäßen 15 Trägermaterialien oder des erfindungsgemäßen Verfahrens das zeitaufwendige Kultivieren pathogener Mikroorganismen entfällt und somit auch das mit der Vermehrung pathogener Keime verbundene Risiko minimiert wird. Ein besonders großer Vorteil der erfindungsgemäßen Methode besteht gerade darin, daß die Nachweise auch dann gelingen, wenn die Konzentrationen der nachzuweisenden 20 Substanzen im Abbildungsmaterial sehr gering sind.

- Mit den erfindungsgemäßen Trägermaterialien gelingt auch der direkte orts- und stoffspezifische Nachweis von Mikroorganismen auf den Zähnen, ohne die auf den Trägermaterial haftenden Mikroorganismen kultivieren zu müssen. Somit 25 entfällt beispielsweise auch der Zusatz von Nährstoffen zum Trägermaterial, wie dies in der US-A-4 976 951 beschrieben ist.

- Ebenso vorteilhaft ist die Einfachheit der beschriebenen Verfahren, die bei vielen Erkrankungen eine problemlose Früherkennung mit geringem Aufwand und ohne 30 wesentliche Mehrkosten für den Behandler und den Patienten gestattet.

Als Trägermaterial kommen allgemein beispielsweise dentale Abformmassen oder Filme auf Silikon-, Polyether-Silikon-, Polyether-, Alginat- oder Hydrokolloidbasis in Frage. Ebenso geeignet als Trägermaterial sind alle anderen bekannten Kunststoffe, beispielsweise Polyethylene, Polypropylene, Poly(meth)acrylate, Polyurethane, Polycarbonate, Polysulfid, Polyvinylchloride oder Kautschuk. Darüber hinaus sind Hydrogele, beispielsweise auf Polyvinylpyrrolidon- oder Polyvinylalkoholbasis, als Trägermaterial geeignet. Gleichfalls geeignet für die Durchführung der erfindungsgemäßen Verfahren sind dentale Gipszubereitungen und ähnliche Massen.

10

Die Basis vieler Abdruckmassen bilden additionsvernetzende oder kondensationsvernetzende Silikone, Polyether-Silikone oder Polyether. Diese Materialien sind im Stand der Technik ausführlich beschrieben worden, so daß es sich erübrigt, hier näher darauf einzugehen. Additions- oder kondensationsvernetzende Silikone sind beispielsweise in der US-A-3 897 376, in der EP-B-0 231 420 sowie in der dort auf Seite 3 erwähnten US-A-4 035 453, weiterhin in der EP-A-0 480 238 (siehe insbesondere Seite 2, Zeilen 3 - 26) und in der EP-B-0 268 347 beschrieben. Die Offenbarung dieser Schriften soll hier durch Inbezugnahme mitumfaßt sein. Polyether-Silikone sind unter anderem beispielsweise in der DE-A-37 41 575 sowie in der DE-A-38 38 587 beschrieben, deren Offenbarung hier ebenfalls mitumfaßt sein soll. Polyether schließlich sind beispielsweise in der DE-B-17 45 810 sowie in der DE-A-43 06 997 beschrieben, deren Offenbarung hier gleichfalls mitumfaßt sein soll.

Ein weiteres mögliches Trägermaterial kann auch eine polymerisierbare Flüssigkeit oder eine Lösung einer polymeren Substanz sein, die auf die zu untersuchenden Stellen aufgesprüht oder aufgetragen, beispielsweise aufgepinselt wird. Typischerweise handelt es sich hierbei um Lacke auf Nitrocellulosebasis mit einem flüchtigen Lösungsmittel sowie gegebenenfalls weiteren Hilfsstoffen, die zu einer festen Schicht aushärten, die nach Freisetzung des Wirkstoffes vom Substrat abgezogen werden kann. Verwendbar sind allgemein alle Polymeren, die in geeigneten leicht flüchtigen Lösungsmitteln

aufgenommen werden können. Bekannt ist beispielsweise auch die Verwendung von Polyurethanen in Aceton. Geeignete filmbildende Systeme sind aus der Farben- und Lackchemie hinreichend bekannt (Standardwerk der F+L-Industrie).

- 5 Das erfindungsgemäße Trägermaterial kann zunächst die zu untersuchende Markerverbindung intraoral ortspezifisch aufnehmen. Die Markerverbindung wird in einer anschließenden Prozedur auf bzw. im Trägermaterial orts- und stoffspezifisch nachgewiesen, quantifiziert bzw. diagnostisch evaluiert, wobei die Markerverbindung auch erst als Folge einer katalytischen, chemischen, 10 biochemischen Reaktion gebildet werden kann. Die zu analysierende Markerverbindung kann beispielsweise über ionische, polare, unpolare oder hydrophobe Wechselwirkungen auf bzw. im Trägermaterial örtlich fixiert werden. Die Ausbildung von Mikrostrukturen und/oder Mikroräumen in den Trägermaterialien kann die Aufnahme und Fixierung der zu untersuchenden 15 Marker-Verbindungen unterstützen.

- Das Trägermaterial enthält in einer bevorzugten Ausführungsform mindestens eine Komponente oder aber zur Vereinfachung der diagnostischen Prozedur alle benötigten Komponenten des diagnostischen Testsystems. Diese diagnostischen 20 Zusätze können beispielsweise über ionische, polare, unpolare oder hydrophobe Wechselwirkungen auf bzw. im Trägermaterial örtlich fixiert werden. Eine örtliche Fixierung von diagnostischen Zusätzen ist auch dadurch möglich, daß die diagnostischen Zusätze zuerst an hochmolekulare Träger fixiert und anschließend in die Trägermasse eingeknetet werden. Hierdurch wird die 25 Diffusionsbewegung der diagnostischen Zusätze im Trägermaterial kontrolliert. Die Ausbildung von Mikrostrukturen und/oder Mikroräumen in den Trägermaterialien kann die Aufnahme und Fixierung der Komponenten unterstützen. Die Komponenten können in den erfindungsgemäßen Trägermaterialien frei verfügbar oder in einer anderen Phase vorliegen.

30

Die erfindungsgemäßen Trägermaterialien enthalten 0,0001 bis 10 Gew.-%, bevorzugt 0,01 bis 1 Gew.-% diagnostische Zusätze, jedoch mindestens soviel

Zusätze, daß die gewünschte Wirkung wahrgenommen werden kann. Bei der Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens müssen diagnostische Zusätze in einer solchen Menge auf Trägermaterialien aufgebracht werden, daß die gewünschte Wirkung wahrgenommen werden kann.

5

Erwünschte Wirkungen können alle wahrnehmbaren Signale sein. Hierunter mit eingeschlossen sind beispielsweise Farbsignale, beispielsweise fluoreszierende, UV-, VIS-, phosphoreszierende oder lumineszierende Signale, die gegebenenfalls mit speziellen Geräten detektiert werden müssen. Ebenso können Signale durch Anwendung der erfindungsgemäßen Verfahren erzeugt werden, die durch Thermographie, Spektroskopie, Chromatographie oder auch durch Analyse der Topographieänderung der Trägermaterialien wahrgenommen werden können.

10

Als diagnostische Zusätze sind beispielsweise Farbstoffindikatoren, Antikörper, Enzyme und alle anderen Substanzen geeignet, die dem mit der Entwicklung von diagnostischen Testsystemen vertrauten Fachmann geläufig sind.

15

In einer speziellen Ausführungsform der Erfindung können die diagnostischen Zusätze in mikroverkapselter Form vorliegen. In einer Mikrokapsel kann eine Vielzahl von Molekülen diagnostischer Zusatzstoffe eingeschlossen sein. Von besonderem Vorteil ist bei der Verwendung von mikroverkapselten diagnostischen Substanzen der auftretende Potenzierungseffekt.

20

Zur Mikroverkapselung von Wirkstoffen sind verschiedene Verfahren bekannt. Dazu gehört die Grenzflächen-Polykondensation, die an den Grenzflächen einer Dispersion aus zwei nicht miteinander mischbaren Flüssigkeiten stattfindet. Die Reaktionspartner dieser Polykondensation sind dabei in verschiedenen Phasen enthalten. Durch die Ausbildung der Kapselwand an der Grenzfläche der dispergierten Tröpfchen werden diese im Inneren der Kapsel eingeschlossen. In der WO-91/12884 werden beispielsweise eine wäßrige Phase enthaltende Mikrokapseln und deren Herstellung beschrieben. Die prinzipielle Herstellung von

25

30

Mikrokapseln über Grenzflächen-Polykondensation ist auch in DE-A-39 18 146 und DE-C-39 18 141 beschrieben.

Als diagnostische Zusatzstoffe, die in den Mikrokapseln eingeschlossen werden, eignen sich beispielsweise Farbstoffe oder Komponenten von Farbstoffen, die erst durch Reaktion mit mindestens einer Komponente, die nicht in denselben Mikrokapseln eingeschlossen ist, oder die aber bereits im Trägermaterial vorliegt, nachträglich auf das Trägermaterial aufgebracht wird.

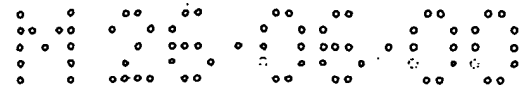
10 Ganz allgemein können bei der Verwendung mehrkomponentiger Wirkstoffsysteme die einzelnen Komponenten getrennt voneinander, jedoch jeweils eingeschlossen in Mikrokapseln, oder auch teilweise mikroverkapselt und teilweise frei vorliegen. Selbstverständlich ist es auch möglich, bei mehr als zweikomponentigen Wirkstoffsystemen, mindestens zwei Komponenten jeweils  
15 mikroverkapselt und mindestens eine andere Komponente frei im Trägermaterial vorrätig zu halten. Essentiell ist jeweils nur, daß eine Reaktion der Wirkstoffkomponenten zum gewünschten Endprodukt durch das getrennte Vorhalten der einzelnen Komponenten solange unterbunden wird, bis ein Reaktionspartner durch eine Zerstörung der Mikrokapselwand freigesetzt wird.

20

Da Abformmaterialien üblicherweise zweikomponentig angeboten werden, kann es vorteilhaft sein, verschiedene Komponenten der Wirkstoffe in verschiedenen Komponenten der Abformmassen, namentlich der Basis- und der Katalysatorpaste, mikroverkapselt oder frei vorzuhalten.

25

Bei der Auswahl von geeigneten Trägermaterialien ist allgemein darauf zu achten, daß diese mit den diagnostischen Substanzen kompatibel sind. Beispielsweise sollten die Trägermaterialien bei der Verwendung säurelabiler Mikrokapseln keine Pufferkapazität aufweisen, die ausreichen würde, den  
30 geringen pH-Unterschied, der durch die bakteriellen Stoffwechselprodukte hervorgerufen wird, abzupuffern. Bei der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen beispielsweise sollten die Trägermaterialien selbstverständlich keine Bestandteile



enthalten, die im relevanten Wellenlängenbereich selbst fluoreszieren. Die Forderung nach inerten Trägermaterialien im Sinne der diagnostischen Zielsetzung ist für den Fachmann trivial und kann vom Fachmann problemlos beachtet werden.

5

Die Erfindung wird nachfolgend durch Beispiele näher erläutert, ohne daß sie durch diese beschränkt werden soll.

10

### Herstellungsbeispiel 1

Abformmasse auf Basis eines additionsvernetzenden Silikons mit diagnostischen Zusatzstoffen zur Bestimmung der Proteaseaktivität

15 28,2 Teile eines Vinyl-endgestoppten Polydimethylsiloxans mit einer Viskosität von 2000 mPa·s bei 23°C, 2,5 Teile eines SiH-Gruppen-haltigen Polydimethylsiloxans mit einer Viskosität von 60 mPa·s bei 23°C, 9,7 Teile eines Polydimethylsiloxans mit einer Viskosität von 50 mPa·s bei 23°C, 8,1 Teile einer silanisierten pyrogenen Kieselsäure, 49,4 Teile Quarzfeinstmehl sowie als diagnostische Zusatzstoffe 2,0 Teile Gly-Gly und 0,3 Teile Benzoylarginin-sulfanylamid werden in einem Knetter durch Mischen zu einer homogenen Basispaste vereinigt.

20

Die Katalysatorpaste wird durch Vermischen von 21,6 Teilen eines Vinyl-endgestoppten Polydimethylsiloxans mit einer Viskosität von 2000 mPa·s bei 25 23°C, 8,5 Teilen einer silanisierten pyrogenen Kieselsäure, 53,1 Teilen Quarzfeinstmehl, 13,6 Teilen eines Polydimethylsiloxans mit einer Viskosität von 50 mPa·s bei 23°C und 3,4 Teilen einer Lösung von 1,3 Teilen eines Komplexes aus Platin und Divinyltetramethyldisiloxan in einem Polydimethylsiloxan mit einer Viskosität von 50 mPa·s bei 23°C hergestellt.

30



## Herstellungsbeispiel 2

Trägermaterial zur ortsspezifischen Aufnahme von Marker-Substanzen ohne diagnostische Zusatzstoffe

- 5 Dieses auf Polyethersilikon basierende Trägermaterial wurde gemäß Herstellungsbeispiel 1 der Patentschrift DE-A-38 38 587 hergestellt.

## Anwendungsbeispiel 1

### Diagnose

10

Zur Simulation der Abdrucknahme eines stark bakterienbefallenen Gebisses werden auf die ausgehärtete Abformmasse nach Herstellungsbeispiel 1 50 µl einer 1,05 µmolaren Lösung der aus der Kulturlösung von *Porphyromonas gingivalis* isolierten Proteasen Gingipain R und/oder Gingipain K gegeben. Nach 15 einer Einwirkzeit von 15 min bei 36°C wird auf die Oberfläche des Trägermaterials eine Lösung von 1g  $\text{p-NaO}_3\text{S-C}_6\text{H}_4\text{-N}_2^+ \text{BF}_4^-$ , 3 g Natriumacetat und 3 g Eisessig in 100 ml Wasser gesprüht.

- 20 An den Stellen, die mit der Gingipain R Lösung kontaktiert wurden, bildet sich eine intensiv gelbe Färbung.

## Anwendungsbeispiel 2

25

### Bestimmung der pH-Änderung

- Ein nicht-verunreinigter Prüfkörper des Trägermaterials gemäß Herstellungsbeispiel 2 wird mit einer 5%-igen Milchsäurelösung zur Simulation einer mit bakteriellen Stoffwechselprodukten versetzten Oralumgebung dotiert. 30 Nach einer Einwirkzeit von 1 bis 5 min wird der Prüfkörper mit einer pH-Indikatorlösung (Oregon green®, Molecular Probes) besprüht. Der Prüfkörper wird mit einer geeigneten Lampe bei 480 nm bestrahlt und die Fluoreszenzemission

bei 500 nm beobachtet. Es gilt, je alkalischer die Umgebung, umso geringer ist die Fluoreszenzemission des pH-Indikators. Die Punkte mit Säuredotierung geben sich auf dem Prüfkörper durch eine geringere Fluoreszenzemission zu erkennen. Zur Befunderhebung kann ein Bilddokumentationssystem eingesetzt werden.

### Anwendungsbeispiel 3

#### Bestimmung von Milchsäure

10

Bei der Herstellung des Prüfkörpers des Trägermaterials gemäß Herstellungsbeispiel 2 wird Lactatdehydrogenase als Bestandteil eines diagnostischen Systems dem Trägermaterial bis zu einer Konzentration von 100 Units/cm<sup>3</sup> beigemischt. Der Prüfkörper wird mit einer Lösung, bestehend aus 100 mg Calciumlactatpentahydrat, 10 mg NAD, 5 mg 3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT), 5 mg Phenazinmethosulfat (PMS) in 20 ml 50 mM Tris/HCl pH 8,0, dotiert. Die Punkte mit Milchsäuredotierung geben sich auf dem Prüfkörper durch eine intensive Blaufärbung zu erkennen. Alternativ kann auf Redoxindikatoren verzichtet werden, wenn die Bildung von NADH durch die Fluoreszenzzunahme bei 460 nm Emission (Anregung bei 339 nm) beobachtet wird.

20

### Anwendungsbeispiel 4

#### Bestimmung von Calcium

25

Ein Prüfkörper des Trägermaterials gemäß Herstellungsbeispiel 2 wird zur Simulation bakterieller Abbauprodukte der Zahnschmelze mit einer 1%-igen Calciumdichloridlösung dotiert. Nach einer Einwirkzeit von 1 bis 5 min wird der Prüfkörper mit einer Ca-Indikatorlösung (Oregon Green<sup>®</sup> 488 BABTA-2, Molecular Probes) besprüht. Der Prüfkörper wird mit einer geeigneten Lampe bestrahlt und die Fluoreszenzemission bei 520 nm beobachtet. Es gilt, je höher die

30

Calciumkonzentration, umso höher die Fluoreszenzemission des Calciumindikators. Die Punkte mit Säuredotierung geben sich auf dem Prüfkörper durch eine höhere Fluoreszenzemission zu erkennen. Zur Befunderhebung kann ein Bilddokumentationssystem eingesetzt werden.

5

### Anwendungsbeispiel 5

#### Immunologischer Nachweis von Matrix Metalloproteinase 9

- 10 In ein Trägermaterial gemäß Herstellungsbeispiel 2 werden kommerziell erhältliche monoklonale Antikörper gegen Matrix Metalloproteinase 9 (MMP 9) als Komponente eines diagnostischen Systems bis zu einer Konzentration von 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  eingebracht. Der Prüfkörper wird mit einer Lösung von MMP 9 dotiert. Nach einer Einwirkzeit von 15 Minuten wird der Prüfkörper mit einer 1%igen
- 15 Bovine-Serum-Albumin-Lösung (BSA-Lösung) gewaschen. Anschließend wird der Prüfkörper mit einer Lösung Peroxidase-gekoppelter polyklonaler Antikörper besprüht, die sich gegen andere Epitope von MMP 9 richten, welche nicht vom ersten monoklonalen Antikörper belegt sind.

- 20 Die Gewinnung von polyklonalen Antikörpern folgt den klassischen Standardprozeduren, wie sie in Hamada, S.; Slade, H.D. Microbiological Reviews (1980) 44, 331 - 384 und in der dort zitierten Literatur beschrieben wurden.

- Der Prüfkörper wird wiederum mit 1%-iger BSA-Lösung gewaschen.
- 25 Abschließend wird der Prüfkörper mit einer Standardreagentienlösung (z.B. SIGMA FAST™ OPD) mit o-Phenylendiamindichlorid und  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Substrate besprüht und die gelborange Farbentwicklung beobachtet. Die Farbentwicklung tritt nur an den Stellen auf, die mit MMP 9 dotiert worden sind.

## Anwendungsbeispiel 6

### Immunologischer Nachweis von Mikroorganismen

5 In ein Trägermaterial gemäß Herstellungsbeispiel 2 werden als Komponenten eines diagnostischen Systems kommerziell erhältliche Lektine (beispielsweise Concanavalin A) eingebracht, die über ihre spezifische Affinität zu Glykoproteinen Mikroorganismen zu binden vermögen (Hamada, S.; Slade, H.D. Microbiological Reviews (1980) 44, 331 - 384). Die Prüfkörper werden zur Simulation einer bakteriell belasteten Oralumgebung mit definierten Lösungen von Streptococcus mutans dotiert, so daß pro Dotierung eine bekannte Anzahl von Streptococcus mutans vorliegt. Nach einer Einwirkzeit von 15 Minuten wird der Prüfkörper mit einer 1%-igen BSA-Lösung gewaschen. Anschließend wird der Prüfkörper mit Peroxidase-gekoppelten polyklonalen Antikörpern besprüht, die sich gegen Streptococcus mutans-Oberflächenantigene richten.

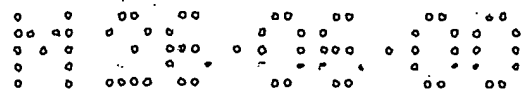
15

In bekannten Standardprozeduren können derartige Antikörper im Kaninchen erzeugt werden.

20 Der Prüfkörper wird wiederum mit 1%-iger BSA-Lösung gewaschen. Abschließend wird der Prüfkörper mit einer Standardreagentienlösung (z.B. SIGMA FAST™ OPD) mit o-Phenylendiamindichlorid und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Substrate besprüht und die gelborange Farbentwicklung beobachtet. Die Farbentwicklung tritt nur an den Stellen auf, die mit Streptococcus mutans dotiert worden sind.

Patentansprüche

1. Verformbares, härtpbares oder filmbildendes Trägermaterial, dadurch gekennzeichnet, daß es diagnostisch nutzbare Zusatzstoffe für die orts- und stoffspezifische intraorale Diagnose enthält.
2. Trägermaterial nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es diagnostisch nutzbare Zusatzstoffe zum intraoralen ortspezifischen Nachweis von pathogenen Substanzen und/oder von Mikroorganismen oder zum intraoralen ortspezifischen Nachweis von Substanzen, die auf Munderkrankungen oder Heilungsprozesse hinweisen, enthält.
3. Trägermaterial nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die diagnostisch nutzbaren Zusatzstoffe in mikroverkapselter Form vorliegen.
4. Trägermaterial nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens soviel diagnostische Zusatzstoffe enthalten sind, daß ein diagnostisches Signal wahrgenommen werden kann.
5. Trägermaterial nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die diagnostischen Zusatzstoffe in einer Menge von 0,0001 bis 10 Gew.-%, bevorzugt 0,01 bis 1 Gew.-% enthalten sind.
6. Trägermaterial zur Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß es aus einer der folgenden Gruppen ausgewählt ist:
  - (i) Abformmassen oder Filme auf Silikon-, Polyethersilikon-, Polyether-, Alginat- oder Hydrokolloidbasis,



- (ii) Kunststoffe aus der Gruppe Polyethylene, Polypropylene, Poly(meth)acrylate, Polyurethane, Polycarbonate, Polysulfid, Polyvinylchloride oder Kautschuk,
- (iii) Hydrogele auf Polyvinylpyrrolidon- oder Polyvinylalkoholbasis, oder
- (iv) dentale Gipszubereitungen.
- 5
7. Verfahren zur Herstellung von Abbildungen für intraorale orts- und stoffspezifische Diagnosezwecke, dadurch gekennzeichnet, daß diagnostisch nutzbare Zusatzstoffe auf verformbare, härtbare oder filmbildende Trägermaterialien, die keine diagnostisch nutzbaren Zusatzstoffe enthalten, in einer solchen Menge aufgebracht werden, daß ein diagnostisches Signal wahrgenommen werden kann.
- 10
8. Verfahren zur Herstellung von Abbildungen für intraorale orts- und stoffspezifische Diagnosezwecke nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß diagnostisch nutzbare Zusatzstoffe auf verformbare, härtbare oder filmbildende Trägermaterialien, die keine diagnostisch nutzbaren Zusatzstoffe enthalten, in einer Menge aufgebracht werden, daß ein diagnostisches Signal in Form des intraoralen orts- und stoffspezifischen Nachweises von pathogenen Substanzen und/oder von Mikroorganismen oder in Form des intraoralen orts- und stoffspezifischen Nachweises von Substanzen, die auf Munderkrankungen oder Heilungsprozesse hinweisen, wahrgenommen werden kann.
- 15
- 20
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß die diagnostisch nutzbaren Zusatzstoffe in mikroverkapselter Form vorliegen.
- 25
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die diagnostischen Zusatzstoffe in einer Menge von 0,0001 bis 10 Gew.-%, bevorzugt 0,01 bis 1 Gew.-%, eingesetzt werden.
- 30

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Trägermaterial aus einer der folgenden Gruppen ausgewählt wird:

5

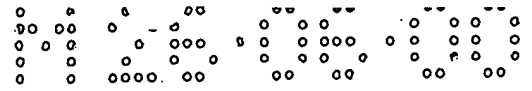
- (i) Abformmassen oder Filme auf Silikon-, Polyethersilikon-, Polyether-, Alginat- oder Hydrokolloidbasis,
- (ii) Kunststoffe aus der Gruppe Polyethylene, Polypropylene, Poly(meth)acrylate, Polyurethane, Polycarbonate, Polysulfid, Polyvinylchloride oder Kautschuk,
- (iii) Hydrogele auf Polyvinylpyrrolidon- oder Polyvinylalkoholbasis, oder
- (iv) dentale Gipszubereitungen.

10

12. Verfahren für die gleichzeitige multiple sowie orts- und stoffspezifische intraorale Befunderhebung, umfassend die Schritte: Abdrucknahme mit verformbarem, härtbarem oder filmbildendem Trägermaterial, das diagnostisch wirksame Zusatzstoffe enthält, und gegebenenfalls Auftragen weiterer diagnostisch wirksamer Zusatzstoffe, oder Abdrucknahme mit verformbarem, härtbarem oder filmbildendem Trägermaterial, das keine diagnostisch wirksamen Zusatzstoffe enthält, und Auftragen diagnostisch wirksamer Zusatzstoffe.

15

20



### Zusammenfassung

#### Trägermaterialien und Abbildungsverfahren für intraorale Diagnosezwecke

- Die Erfindung betrifft verformbare, härtbare oder filmbildende Trägermaterialien,
- 5 welche diagnostisch nutzbare Zusatzstoffe für die orts- und stoffspezifische intraorale Diagnostik enthalten, sowie Verfahren zur Herstellung von Abbildungen für intraorale ort- und stoffspezifische Diagnosezwecke, bei welchen diagnostisch nutzbare Zusatzstoffe auf verformbare, härtbare oder filmbildende Trägermaterialien, die keine diagnostisch nutzbaren Zusatzstoffe enthalten, in
- 10 einer solchen Menge aufgebracht werden, daß ein diagnostisches Signal wahrgenommen werden kann.